

# HAFTA XIII

Gen transfer teknikleri  
GFP plazmid ile HEK-293 hücrelerinde overekspresyon  
GFP siRNA ile susturma,  
Mikroskopik olarak sonuçları değerlendirme

- HEK293, insan embriyonik böbrek hücreleri popüler memeli heterolog ekspresyon sistemi hücreleridir ve rekombinant protein üretiminde sıklıkla kullanılırlar. HEK-293 hücreleri, bu hücrelerde eksprese olan membrane proteinlerinin farmakolojik özellikleri ve yapısal ve fonksiyonel ilişkilerini çalışmak için de kullanılabilir. HEK-293 hücrelerinin rekombinant protein eksprese etmek amacıyla kullanılması, bu hücrelerde verimli olarak plazmid DNA transfeksiyonu yapılabilmesi, translasyonun ve protein prosesinin yüksek oranda doğru olması özelliklerinden kaynaklanır.
- Ancak bu hücrelerin ion kanalları gibi membran proteinleri ekspresyonu için kullanıldığında verimliliğin düşük olduğu görülmüştür. Bu durum genellikle hücre içindeki ya da hücre yüzeyindeki reseptör protein kopya sayısının azlığından kaynaklanmaktadır.

- Ekspresyon verimliliğini artırmanın bir yolu hücre kültürü koşullarının optimize edilmesinden geçer.
- Rekombinant protein ekspresyonunu etkileyen üç major faktör hücre kültürü koşulları, vektör ve konakçı hücre seçimidir.
- Kültür ortam sıcaklığını değiştirmek genellikle etkilidir çünkü sıcaklığın hücre büyümesi, canlılığı protein sentezi ve metabolizması üzerindeki etkisi göz ardı edilemeyecek derecede önemlidir. Bu anlamda, kültür ortam sıcaklığının 37°C nin altına düşürülmesi, hücre büyüme hızını da düşürecektir. Yapılan bazı araştırmalara göre HEK-293 hücrelerinin aksine, CHO hücrelerinde kültür ortam sıcaklığının 30-32°C ye düşürülmesi bazı rekombinant protein ekspresyonlarında artışa sebep olduğunu göstermiştir. Bu durum göstermektedir ki düşük sıcaklığın protein ekspresyonu üzerindeki etkisi hücre hattına spesifiktir ve protein ekspresyonu artışı temel olarak hücrelerin soğuk etkisiyle hücre döngüsünün S ya da G1 fazında arest olmalarından kaynaklanmaktadır.

# Transfekte Hücrenin Takibi

- Araştırmacılar gen düzeyinde yaptıkları manipülasyonun takibini yapabilmek için çalıştıkları genleri markır genlerle etiketlenir. GFP yeşil floresan proteini bu amaçla sıklıkla kullanılan etiketlerdendir.
- GFP geninin ekspresyon plazmidine ligasyonu
  - Ligasyonu takiben GFP, plazmidin kovalent parçası olarak plazmidle aynı zamanda sirkülerize olacaktır. Sadece sirküler form hücre içinde replike olmaktadır.
  - GFP ligasyonu için, GFP ve plazmid aynı restriksiyon enzimleri ile kesilir. Kesim sonunda GFP geni ve plazmid birbiriyle eşleşen uçlara sahip olacaktır.

# GFP Plazmid Ligasyonu

- Örnek ligasyon protokolü

## Materials

The purified restricted GFP

10 x T4 Ligase buffer

T4 DNA Ligase

Water

Restricted plazmid

## Protocol

1. Prepare the following ligation mixes for your restricted GFP: (amounts in  $\mu\text{L}$ )

<u>Sample</u>	<u>A</u>	<u>B</u>
Water	16	11
10 x T4 Ligase buffer	2	2
Restricted GFP	0	5
Restricted plazmid	1	1
T4 DNA Ligase	1	1

2. Incubate the ligation mixtures at 16°C in a heat block until next day.

---

# Hücre Transfeksiyonu

- GFP markır geni içeren plazmidin memeli hücrelerine akarılması için, plazmid direk olarak konsantre  $\text{CaCl}_2$  solüsyonu ile karıştırılır. Bu karışıma damla damla fosfat tamponu eklenir ve presipitat elde edilir.

# Hücre Transfeksiyonu

- Örnek hücre transfeksiyon protokolü

## Materials

Human cells

2.5M CaCl<sub>2</sub>

Plasmid

Hepes buffer

## Protocol

1. Add 50 µl 2.5M CaCl<sub>2</sub> to your tube containing 450 µl DNA. Mix by taking the liquid up and down with your pipet. Avoid air bubbles.
2. Add the 500 µl DNA-CaCl<sub>2</sub>-solution slowly one drop at a time to the tube containing 500 µl 2x Hepes buffer. While you do this, you continuously make bubbles in the solution with a bigger pipet.
3. Leave the mixture for 5 min at room temperature.
4. Add the mixture to your cells one drop at a time.
5. Leave the cells to grow in the incubator overnight.

# Plazmid Üretimi

- GFP içeren plazmidler *E.coli* hücrelerine transforme edilir. Örnek transformasyon protokolü

## Materials

LB- medium

2 LB-agar plates containing kanamycin

2 Eppendorf tubes with *E. coli* cells.

The ligation mixtures from yesterday

Plastic Drigalsky spatulas for plating the bacteria

42°C heat block

## Protocol

1. Transfer 5  $\mu$ L of each ligation mix (A and B) into separate tubes with *E. coli*. Use a pipet tip to stir around.

2. Incubate the transformation tubes on ice for 30 min.

3. Heat-shock the cells in a 42°C heat block for 20 sec. and immediately thereafter incubate on ice for at least 2 min.



# Plazmid Üretimi

---

4. Add 950  $\mu$ L LB-medium to each of the two transformation tubes.

5. Incubate at 37°C for 1 hour.

---

Protocol for cloning PFP into mammalian cells

Aarhus University, Studiepraktik 2013

6. Plate 150  $\mu$ L of each transformation mix on each of two LB-agar plates marked A and B. Write name and group on the plates.

7. The agar plates are incubated (bottom up!) in a 37°C incubator overnight.

# Hücre Transfeksiyonu

- Örnek protokol

## Materials

Waste tube

PBS wash buffer

Media

## Protocol

1. Remove the old media from the cells, by transferring it to a waste tube.
2. Wash the cells with 5 mL wash buffer (PBS). Be careful not to disturb the cells. Add the buffer, let it flow around and empty the flask again by transferring the buffer to the waste tube.
3. Add 10 mL of new media.

# GFP İçeren Koloni Taraması

- Koloniler GFP alıp almadığı yönünde koloni PCR tekniği ile kontrol edilir.

## Materials

You will get 55  $\mu\text{L}$  of following stock mix made by the instructors:

5.5  $\mu\text{L}$  10 x SuperTaq buffer

0.55  $\mu\text{L}$  SuperTaq DNA polymerase

2.2  $\mu\text{L}$  CMV forward primer, 5 pmol/ $\mu\text{L}$

2.2  $\mu\text{L}$  eGFP – N reverse primer, 5 pmol/ $\mu\text{L}$

1.1  $\mu\text{L}$  10 mM dNTP

43.45  $\mu\text{L}$  water

Eppendorf tubes

1% agarose gel (incl. GelRed)

Gel apparatus

Power supply

6 x Ficoll DNA loading buffer (Ficoll pulls the dye down in the wells)

100 bp DNA size marker (see appendix for the size of each band in the marker)

## Protocol

1. Number 5 PCR tubes (1-5).

2. Add 10  $\mu\text{L}$  stock mix to each of the PCR tubes.

---

4. Pick the 5 colonies with a small pipette tip (those for Pipetman P10) by dipping the pipette tip into a colony and then dipping it in one of the PCR tubes and stir a bit about, so that the cells gets into the liquid. Close the lids on the PCR tubes.

6. The 5 PCR tubes are placed in the PCR machine (remember team numbers!) and the PCR is started.

7. The PCR cycle program is:

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. Initial denaturation of template DNA:     | 2 min at 95°C               |
| 2. Amplification cycles (repeated 30 times): | 30 sec. at 95°C (melting)   |
|  | 30 sec. at 60°C (annealing) |
|  | 1 min. at 72°C (elongation) |

8. After ended PCR add 2  $\mu$ L 6 x Ficoll DNA loading buffer to each PCR tube and to the size marker.

9. Load the agarose gel with the entire volumes of each sample. Write down where you load the samples. (See appendix for how to load a gel).

10. Run electrophoresis at 60 mA until the blue dye is around 2.5 cm from the bottom of the gel.

11. Visualize the agarose gel on a UV box and photograph your gel.

12. Write up sample numbers on your photograph.

- Do all the samples contain the plasmid with the insert?

# Hücrelerin Görüntülenmesi

- GFP'li hücreler koloni PCR ile konfirme edildikten sonra floresan mikroskopu altında direkt olarak görüntülenebilir.

